

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2005 年10 月13 日 (13.10.2005)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2005/095441 A1

(51) 国際特許分類: C07K 5/08, A61K 7/06,  
38/00, A61P 17/14, C07K 5/10, 7/06

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/005677

(22) 国際出願日: 2005 年3 月28 日 (28.03.2005)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2004-108449 2004 年3 月31 日 (31.03.2004) JP  
特願2004-200862 2004 年7 月7 日 (07.07.2004) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立  
行政法人産業技術総合研究所 (NATIONAL INSTI-  
TUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND  
TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区  
霞が関一丁目3 番1 号 Tokyo (JP). 特許技術開発株  
式会社 (PATENT TECHNOLOGY DEVELOPMENT  
INC.) [JP/JP]; 〒1620055 東京都新宿区余丁町1 4-4  
NH市ヶ谷ビル3 階 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 岡 修一 (OKA,  
Syuichi) [JP/JP]; 〒3058566 茨城県つくば市東一丁目  
1 番地1 中央第6 独立行政法人産業技術総合研究所  
内 Ibaraki (JP). 鶴田 明稚 (TSURUDA, Akinori) [JP/JP];  
〒3058566 茨城県つくば市東一丁目1 番地1 中央第  
6 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP).  
河野 泰広 (KAWANO, Yasuhiro) [JP/JP]; 〒3058566 茨  
城県つくば市東一丁目1 番地1 中央第6 独立行  
政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 鈴木 三男  
(SUZUKI, Mitsuo) [JP/JP]; 〒1620055 東京都新宿区余

丁町1 4-4 NH市ヶ谷ビル3 階 特許技術開発株  
式会社内 Tokyo (JP). 中里 敏 (NAKAZATO, Satoshi)  
[JP/JP]; 〒1620055 東京都新宿区余丁町1 4-4 NH  
市ヶ谷ビル3 階 特許技術開発株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 阿形 明, 外 (AGATA, Akira et al.); 〒1050004  
東京都港区新橋二丁目1 2 番5 号池伝ビル3 階 阿  
形特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が  
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,  
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,  
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,  
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,  
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,  
SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,  
US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護  
が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA,  
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ,  
BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE,  
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU,  
IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),  
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部  
分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: EPITHELIAL CELL GROWTH PROMOTER

(54) 発明の名称: 上皮系細胞増殖促進剤

(57) Abstract: It is intended to provide a novel oligopeptide which can be relatively easily produced, has not only a hair growth-stimulating effect but also an effect of promoting the growth of epithelial cells (for example, skin regeneration) and can easily pass through the horny layer to thereby reach the desired target cells in which its effects are to be exerted. Namely, water-soluble oligopeptides containing a prolyl isoleucyl glycyl unit or an isoleucyl glycyl serine unit and having from 3 to 7 amino acids and water-soluble salts thereof.

(57) 要約: 本発明は、比較的簡単に製造することができ、育毛作用のみではなく、皮膚再生のような上皮系細胞増殖促進作用を有する上に、角質層を容易に通過して所望のターゲット細胞に達して効果を発揮し得る新規なオリゴペプチドを提供することを目的としてなされたもので、プロリルイソロイシルグリシル単位又はイソロイシルグリシルセリン単位を含むアミノ酸3～7までの水溶性オリゴペプチド及びそれらの水溶性塩である。



WO 2005/095441 A1

## 明 細 書

### 上皮系細胞増殖促進剤

#### 技術分野

- [0001] 本発明は、育毛促進効果、皮膚再生促進効果、皮膚潰瘍治療効果、粘膜損傷治療効果などの上皮系細胞増殖促進効果を有する新規な水溶性オリゴペプチド、さらに詳しくいえば特定のアミノ酸列を含む3〜7個のアミノ酸単位からなる水溶性オリゴペプチド、その水溶性塩及びそれらを有効成分とする上皮系細胞増殖促進剤に関するものである。

#### 背景技術

- [0002] 最近、発毛、脱毛の制御機構(メカニズム)が明らかにされるとともに、育毛剤に対する社会的関心が強まり、育毛作用を有する新規化合物、遺伝子研究に基づく成分、漢方の組合せなど種々の新しい育毛剤が提案されている。
- [0003] 図1は、発毛、脱毛を繰り返す毛髪(ヘアサイクル)を示す説明図であるが、通常の毛髪はその本体1の毛根部2に毛乳頭3を有し、その上部に毛母細胞4を備えており、成長後毛髪本体1は退縮期(Catagen)となり、約2〜3週間で成長が停止し、その後2〜3か月間休止期(Telogen)に入る。その間に毛根部2は活動を続け、新しい毛髪本体1'を発生する。この新しい毛髪本体1'は引き続き成長期(Anagen)に入り、古い毛髪本体1を脱毛させて、さらに成長を維持し、約5〜6年で元の毛髪を再生する。
- [0004] 育毛剤は、このようなヘアサイクルの各時期において、毛母細胞の増殖を促進し、休止期において成長期を誘導したり、成長期を延長したり、退縮期への移行を遅延させる作用を有し、発毛の促進又は脱毛の抑制を行わせるものである。
- [0005] そして、このような育毛剤として、これまでに、例えば6-(1-ピペリジニル)-2, 4-ピリミジンジアミン-3-オキシド(ミノキシジル)を有効成分とした育毛剤(米国特許第4139619号明細書参照)、ミノキシジル1〜6質量%と、多価アルコール、エタノール、塩酸ピリドキシン及び水を含有してなる育毛組成物(特開2002-326913号公報参照)、繊維芽細胞増殖因子-10(FGF-10)を有効成分として含む育毛剤(特開平10-2

79501号公報参照)、特定の脂肪酸エステル、エーテル、モノグリセリド硫酸エステル塩又はモノアルキルグリセリルエーテル硫酸エステル塩を有効成分とする養毛剤(特開平11-246359号公報参照)、CRF1受容体アンタゴニストを有効成分とする育毛剤(国際公開第02/019975号パンフレット参照)、血行促進効果を有する生薬抽出物とビタミン又はその誘導体とを有効成分とし、水溶性高分子が配合されてゲル化されたエアゾール用組成物と、噴射剤とを含有する育毛用エアゾール製剤(特開平7-101834号公報参照)などが提案されている。

- [0006] また、特殊なものとして、式  $R^1\text{-Met-Ile-XR}^2$  (式中、XはTrp、Phe、Trp-Leu、Phe-Leu、Tyr-Leu、Ile-Leu又はLeu-Leuであり、 $R^1$ は水素原子、アミノ基の保護基、 $R^2$ はヒドロキシ又はカルボキシル基の保護基である) で表わされるペプチド又は薬理的に許容される塩を有効成分とする経口育毛剤が知られている(国際公開第00/29425号パンフレット参照)。

そのほか、極く最近の新聞情報として、6-ベンジルアミノプリン(サイトプリン)とペンタデカンとを組み合わせた育毛剤の発売が報じられている(日経産業新聞、平成16年3月2日号参照)。

- [0007] これらの育毛剤は、それぞれ長所を有し、かなりの効果が認められているものもあるが、すべての症状に対して完全に対応し得るものではない上に、原料の入手が困難なものもあり、実用に供するには必ずしも満足できるものとはいえない。このため、この分野においてはさらに優れた効果を発揮する新規な育毛剤の出現が要望されている。

- [0008] 他方、オリゴペプチド又はその重合物を有効成分とする生理活性物質としては、コラーゲン又はゼラチンのコラーゲナーゼによる分解物中のグリシン残基1個とそれ以外のアミノ酸残基2個とから構成されるトリペプチドの、平均分子量280-20000をもつ重合体からなる老化防止のための皮膚外用剤(特開2000-309521号公報参照)、(Gly-Ala-Arg)、(Gly-Ala-Hyp)、(Gly-Ala-Lys)、(Gly-Pro-Ala)、(Gly-Pro-Arg)、(Gly-Pro-Hyp)及び(Gly-Pro-Ser)のトリペプチドの混合物を有効成分とするコラーゲン産生促進剤(特開2003-137807号公報参照)などが知られているが、トリペプチドを有効成分とする上皮系細胞増殖促進剤はこれまで知ら

れていない。

## 発明の開示

- [0009] 本発明は、比較的簡単に製造することができ、育毛作用のみではなく、皮膚再生のような上皮系細胞増殖促進作用を有する上に、角質層を容易に通過して所望のターゲット細胞に達して効果を発揮し得る新規な水溶性オリゴペプチドを提供することを目的としてなされたものである。
- [0010] 本発明者らは育毛剤として有用な化学物質を開発するために鋭意研究を重ねた結果、バチルス(Bacillus)属バクテリアの培養上清の抽出物中に、優れた育毛効果を示す活性物質が存在すること、及び、育毛作用がこの活性物質中の特定のオリゴペプチド構造に起因すること、しかもこのオリゴペプチド構造を有する特定のポリペプチドは、いずれも所望の育毛効果を示すだけでなく、皮膜移植、皮膚潰瘍や老化皮膚復元の際の細胞再生を促進する効果を示すことを見出した。さらに、特定のアミノ酸単位を有する水溶性オリゴペプチドが優れた上皮系細胞増殖促進作用を示すことを見出し、この知見に基づいて本発明をなすに至った。
- [0011] すなわち、本発明は、プロリルイソロイシルグリシル単位又はイソロイシルグリシルセリン単位を含むアミノ酸単位3〜7個を有する水溶性オリゴペプチド及びそれらの水溶性塩と、その水溶性オリゴペプチド及びそれらの水溶性塩の中から選ばれた少なくとも1種を有効成分とする上皮系細胞増殖促進剤を提供するものである。
- [0012] 本発明の上皮系細胞増殖剤における水溶性オリゴペプチドの作用は、これらのオリゴペプチドそのものだけでなく、これらのオリゴペプチド単位をその分子構成単位として有するポリペプチドにおいても発揮されるが、分子量が500以上になると水に難溶になるので育毛剤としては好ましくない。
- [0013] このような水溶性オリゴペプチドの中で、トリペプチドとしては、イソロイシルグリシルセリン、プロリルイソロイシルグリシンがある。またテトラペプチドとしては、例えばこのトリペプチドの前後にグリシル、アラニル、アルギニル、アスパラギル、リジル、セリル、バリル又はグルタミル基などのアミノ酸残基が結合したものを挙げることができるが、好ましいのはグリシルプロリルイソロイシルグリシン(配列表配列番号1)及びプロリルイソロイシルグリシルセリン(配列表配列番号2)である。

- [0014] ペンタペプチドとしては、例えば、グリシルプロリルイソロイシルグリシル(配列表配列番号1)基の前後にセリル基又はトレオニル基などのアミノ酸残基が結合したものを挙げることができるが、好ましいのはグリシルプロリルイソロイシルグリシルセリン(配列表配列番号3)及びグリシルプロリルイソロイシルグリシルトレオニン(配列表配列番号4)である。
- [0015] また、ヘキサペプチドやヘプタペプチドとしては、上記ペンタペプチド単位をカルボキシル基末端に有するもの、例えばアラニルグリシルプロリルイソロイシルグリシルセリン(配列表配列番号5)、セリルグリシルプロリルイソロイシルグリシルセリン(配列表配列番号6)、グリシルセリルグリシルプロリルイソロイシルグリシルセリン(配列表配列番号7)などが好ましい。
- [0016] 本発明の水溶性オリゴペプチドは、遊離形のものであってもよいし、また水溶性塩であってよい。この水溶性塩としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩、アンモニウム塩などがある。
- [0017] 本発明のオリゴペプチドは、ポリペプチド合成の際にペプチド結合を形成する場合に慣用されている方法、例えば縮合剤法、活性エステル法、アジド法、混合酸無水物法などにより $\alpha$ -アミノ基を保護した原料アミノ酸とカルボキシル基を保護したアミノ酸とを反応させてペプチドを形成したのち、保護基を脱離する工程を繰り返すことによって製造することができる。
- [0018] この縮合剤法は、最も一般的なペプチド結合の形成方法であって、この際の縮合剤としては、例えばジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)、ジイソプロピルカルボジイミド(DIPC)、N-エチル-N'-3-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド(WSCI)及びその塩酸塩(WSCI $\cdot$ HCl)、ベンゾトリアゾール-1-イル-トリス(ジメチルアミノ)ホスホニウムヘキサフルオロリ化物塩(BOP)、ジフェニルホスホリルジアジド(DPPA)などを単独で、或いは、N-ヒドロキシスクシンイミド(HONSu)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBt)、又は3-ヒドロキシ-4-オキソ-3, 4-ジヒドロ-1, 2, 3-ベンゾトリアジン(HOObt)と組み合わせて用いる。
- [0019] 活性エステル法における活性エステルとしては、例えばp-ニトロフェニルエステル(ONp)、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(ONSu)、ペンタフルオロフェニルエステ

ル(OPfp)などを用いる。

[0020] また、アジド法は、アミノ酸又はペプチドに無水ヒドラジンと反応させて対応するヒドラジドを形成させる方法であり、ラセミ化の少ないセグメント縮合法として知られている。

[0021] さらに、混合酸無水物法は、イソブチルオキシカルボニルクロリド、塩化ジエチルアセチル、塩化トリメチルアセチルなどを用いてアミノ酸のカルボキシル基の混合無水物を形成させる方法で、低温においてカルボキシル基を強力に活性化できるので有利である。

[0022] 他方、アミノ酸の保護基としては、酸処理や加水分解や接触還元により容易に脱離するものが用いられる。このような保護基のうち $\alpha$ -アミノ基の保護基としては、ベンジルオキシカルボニル基、tert-ブトキシカルボニル基、9-フルオレニルメトキシカルボニル基、3-ニトロ-2-ピリジンスルフェニル基、メキシベンジルオキシカルボニル基などがある。また、カルボキシル基の保護は、メチル又はエチルエステル、ベンジルエステル、tert-ブチルエステル、フェナシルエステルなどによって行われる。

[0023] また、側鎖にヒドロキシル基をもつ $\alpha$ -アミノ酸の場合は、このヒドロキシル基を保護する必要があるが、この保護基としては、白金黒触媒による接触還元や強酸処理により容易に脱離されるベンジル基や弱酸処理により容易に脱離されるtert-ブチル基が好適である。

このような $\alpha$ -アミノ酸エステル、アミノ基やヒドロキシル基を保護された原料アミノ酸は、市販品として容易に入手可能である。

[0024] 本発明のオリゴペプチドの製造は、原料アミノ酸又はその誘導体を溶媒中に均一に溶解して反応させる液相法、不溶性の樹脂上でペプチド鎖を伸長させていく固相法のいずれでも行うことができるが、自動固相合成装置を用いて行うのが有利である。この方法によると、所望のオリゴペプチドを短時間に、しかも高純度で得ることができる。

[0025] 本発明の新規オリゴペプチド又はその水溶性塩は、ラセミ体として得られるが、所望ならば、慣用の方法により光学分割して光学活性を有するものとして得ることもできる。この光学分割は、ラセミ体のアミノ酸を適当な光学活性物質とのジアステレオマーを

形成させ、これを分別結晶する方法、酵素を用いる方法又はキラルな担体を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による方法などで行うことができる。

[0026] 本発明のオリゴペプチドは、水又はアルコール類に可溶である。このものは、質量分析、赤外吸収スペクトル又は高速液体クロマトグラフィーにより、同定することができる。

[0027] 本発明のオリゴペプチドは、毛包上皮細胞、特に毛母細胞を直接的に増殖促進させる作用、すなわち育毛作用を有するほかに、表皮細胞を直接的に増殖促進させる作用、すなわち培養皮膚移植や、皮膚潰瘍及び皮膚欠損創の治療に有用であるので、上皮系細胞増殖促進剤として用いることができる。

[0028] 本発明の上皮系細胞増殖促進剤の製剤は、有効成分となる前記オリゴペプチドを、水性媒質に0.0001〜5質量%の濃度で溶解することにより得られる。この際用いる水性媒質としては、水と水溶性有機溶剤との混合溶媒が好ましい。

[0029] 水溶性有機溶剤としては、例えばエチルアルコールのようなアルコール類、エチレングリコール、ジエチレングリコール、ジプロピレングリコール、グリセリン、1, 3-ブチレングリコールのような多価アルコール類、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシドのような極性有機溶剤などが用いられる。これらは単独で用いてもよいし、2種以上組み合わせて用いてもよい。好ましい水性溶媒は、水とプロピレングリコールとエチルアルコールとの混合溶媒である。

[0030] この本発明の上皮系細胞増殖促進剤には、所望に応じ、他の育毛作用を有する化合物、例えばミノキシジル、塩化カルプロニウム、ペンタデカン酸グリセリド、酢酸トコフェロール、ピロクトンオラミン、グリチルリチン酸、イソプロピルメチルフェノール、ヒノキチオール、センブリ抽出液、トウガラシチンキやビタミン類例えばビタミンA、ビタミンB、ビタミンC、ビタミンD、ビタミンE、ビタミンF、ビタミンH、ビタミンK、ビタミンP、ビタミンU、パントテニルアルコール、カルチニン、フェルラ酸、 $\gamma$ -オリザノール、リポ酸、オロット酸又はそれらの誘導体を含むことができる。これらの化合物は、本発明の上皮系細胞増殖促進剤中に0.005〜10質量%、好ましくは0.01〜2.0質量%の範囲の量で配合される。

[0031] 本発明の上皮系細胞増殖促進剤には、さらに所望に応じ、香料、着色剤、pH調整

剤、殺菌剤、界面活性剤、噴射剤など、通常の外用液剤に慣用されている添加剤を加えることができる。これら添加剤の量としては、0.001〜5質量%、好ましくは0.01〜2.0質量%の範囲が好ましい。

[0032] 本発明の上皮系細胞増殖促進剤は、頭部又は患部に、1日1〜5回程度塗布を繰り返して使用される。

本発明の上皮系細胞増殖促進剤は、毛包上皮細胞の増殖を用量依存的に促進させることからみて、この中の有効成分であるオリゴペプチドが上皮系細胞増殖促進効果を有することを確認することができた。

また、本発明のオリゴペプチドは上皮細胞に対して、選択的に増殖作用を示すので、他の細胞、例えばガン細胞を増殖するおそれがなく有利である。

#### 図面の簡単な説明

[0033] [図1]は、髪の毛の発毛と脱毛のサイクルを示す説明図である。

[図2]は、実施例1で得られたトリペプチドのマススペクトルである。

[図3]は、実施例2で得られたトリペプチドのマススペクトルである。

[図4]は、実施例3で得られたテトラペプチドのマススペクトルである。

[図5]は、実施例4で得られたテトラペプチドのマススペクトルである。

[図6]は、実施例5で得られたペンタペプチドのマススペクトルである。

[図7]は、実施例7で得られたIGSについての毛包上皮細胞の増殖率を示す棒グラフである。

[図8]は、実施例7で得られたPIGについての毛包上皮細胞の増殖率を示す棒グラフである。

[図9]は、実施例7で得られたPIGSについての毛包上皮細胞の増殖率を示す棒グラフである。

[図10]は、実施例7で得られたGPIGについての毛包上皮細胞の増殖率を示す棒グラフである。

[図11]は、実施例8で得られた上皮系細胞増殖促進剤を塗布したグループ(B)及び対照グループ(A)の14日目の剃毛部位をデジタルカメラで撮影した写真図の画像をコンピューターに入力し、画像解析ソフトを用いて再生毛面積比を百分率で算出し



た図である。

[図12]は、実施例9で得られた毛包上皮細胞の細胞増殖率を示す棒グラフである。

[図13]は、実施例9で得られた表皮細胞の細胞増殖率を示す棒グラフである。

[図14]は、実施例9で得られた真皮繊維芽細胞の細胞増殖率を示す棒グラフである。

[図15]は、実施例9で得られた毛乳頭細胞の細胞増殖率を示す棒グラフである。

### 発明を実施するための最良の形態

[0034] 次に実施例によって本発明を実施するための最良の形態を説明するが、本発明はこれらによって何ら限定されるものではない。

#### [0035] 実施例1

自動固相合成装置(マルチシンテック社製、製品名「Syro2000」)を用い、かつ溶媒としてテトラヒドロフランを、縮合剤としてジシクロヘキシルカルボジイミドをそれぞれ用い、トリエチルアミンの存在下、ヒドロキシル基をtert-ブチル基で保護したセリンのベンジルエステルと、 $\alpha$ -アミノ基を9-フルオレニルメトキシカルボニル基(以下Fmoc基と略す)で保護したグリシンと、 $\alpha$ -アミノ基をFmoc基で保護したイソロイシンとを順次反応させて、N-Fmoc-イソロイシルグリシルセリンのベンジルエステルを製造した。

[0036] 反応終了後、生成中間体をメチルアルコールとジオキサンとの混合溶媒(体積比3:1)の中でフッ化水素酸で処理しクロマトグラフィーで精製することにより保護基の脱離とエステルの加水分解を行ったのち、ラセミ型イソロイシルグリシルセリンを得た。この場合の収率は約46%であった。

[0037] 次に、このトリペプチドをC<sub>18</sub>カラム[ヒューレットパッカード社製、製品名「HP1100」(3.0×250mm)](以下実施例2〜4の純度解析に本カラムを用いた。)に通し、吸着した成分を0.1%トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリルの濃度0〜30%の範囲の溶液により、流速0.4ml/分、20分間で溶出させた。その結果、トリペプチドは保持時間11.671分で溶出され、純度は95.87%であった。

[0038] また、このトリペプチドの質量を、MALDI-MS質量計[テルモバイオアナリシス社製、製品名「Dynamo」](以下実施例2〜4の質量分析に本質量計を用いた。)で分

析した結果、質量( $m/z$ ,  $MH^+$ )は $m/z$ 275. 339であることが分った。この質量分析の結果を図2に示す。

[0039] 実施例2

グリシンのベンジルエステルと $\alpha$ -アミノ基をFmoc基で保護したイソロイシンと、 $\alpha$ -アミノ基をFmoc基で保護したプロリンとを用い、実施例1と全く同様に操作してラセミ型プロリルイソロイシルグリシンを製造した。この場合の収率は約40%であった。

[0040] 次に、このトリペプチドをC<sub>18</sub>カラムに通し、吸着した成分を0.1%トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリルの濃度0~30%の範囲の溶液により、流速0.4ml/分、20分間で溶出させた。その結果、トリペプチドは保持時間14.052分で溶出され、純度は95.93%であった。

[0041] また、このトリペプチドの質量を分析した結果、質量( $m/z$ ,  $MH^+$ )は $m/z$ 285.102であった。この質量分析の結果を図3に示す。

[0042] 実施例3

ヒドロキシル基をtert-ブチル基で保護したセリンのベンジルエステルと、 $\alpha$ -アミノ基をFmoc基で保護したグリシンと、 $\alpha$ -アミノ基をFmoc基で保護したイソロイシンと、 $\alpha$ -アミノ基をFmoc基で保護したプロリンとを用い、実施例1と全く同様に操作して、ラセミ型プロリルイソロイシルグリシルセリン(配列表配列番号2)を得た。この場合の収率は約54%であった。

[0043] 次に、このテトラペプチドをC<sub>18</sub>カラムに通し、吸着した成分を0.1%トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリルの濃度0~40%の範囲の溶液により、流速0.4ml/分、20分間で溶出させた。その結果、テトラペプチドは保持時間12.313分で溶出され、純度は95.11%であった。

[0044] また、このテトラペプチドの質量を分析した結果、質量( $m/z$ ,  $MH^+$ )は $m/z$ 373.963であることが分った。この質量分析の結果を図4に示す。

[0045] 実施例4

グリシンのベンジルエステルと、 $\alpha$ -アミノ基をFmoc基で保護したイソロイシンと、 $\alpha$ -アミノ基をFmoc基で保護したプロリンと、 $\alpha$ -アミノ基をFmoc基で保護したグリシンとを用い、実施例1と全く同様に操作して、ラセミ型グリシルプロリルイソロイシルグリシ

ン(配列表配列番号1)を製造した。この場合の収率は約48%であった。

[0046] 次に、このテトラペプチドをC<sub>18</sub>カラムに通し、吸着した成分を0.1%トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリルの濃度5〜40%の範囲の溶液により、流速0.4ml/分、20分間で溶出させた。その結果、テトラペプチドは保持時間11.648分で溶出され、純度は99.60%であった。

[0047] また、このテトラペプチドの質量を分析した結果、質量( $m/z$ ,  $MH^+$ )は $m/z$ 343.986であった。この質量分析の結果を図5に示す。

[0048] 実施例5

自動固相合成装置(マルチシンテック社製、製品名「Syro2000」)を用い、かつ溶媒としてテトラヒドロフランを、縮合剤としてジシクロヘキシルカルボジイミドをそれぞれ用い、トリエチルアミンの存在下、ヒドロキシル基をtert-ブチル基で保護したセリンのベンジルエステルと、 $\alpha$ -アミノ基をFmoc基で保護したグリシンと、 $\alpha$ -アミノ基をFmoc基で保護したイソロイシンと、 $\alpha$ -アミノ基をFmoc基で保護したプロリンと、 $\alpha$ -アミノ基をFmoc基で保護したグリシンとを順次反応させて、N-Fmoc-グリシルプロリル-イソロイシルグリシルセリン(配列表配列番号3)のベンジルエステルを製造した。

[0049] 反応終了後、生成中間体をメチルアルコールとジオキサンとの混合溶媒(体積比3:1)の中でフッ化水素酸で処理しクロマトグラフィーで精製することにより保護基の脱離とエステルの加水分解を行ったのち、ラセミ型グリシルプロリルイソロイシルグリシルセリンを得た。この場合の収率は約40%であった。

[0050] 次に、このペンタペプチドをC<sub>18</sub>カラム[スperlコ社製、製品名「Discovery C<sub>18</sub>」(4.6×250mm)]に通し、吸着した成分を0.1%トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリルの濃度2〜22%の範囲の溶液により、流速1.5ml/分、20分間で溶出させた。その結果、ペンタペプチドは保持時間9.761分で溶出され、純度は96.9%であった。

[0051] また、このペンタペプチドの質量を、エレクトロスプレー法を用いた正イオン測定によるLC-MS質量計[LC部;アジレント社製、製品名「Agilent1100シリーズ」、MS部;サーモエレクトロン社製、製品名「ThermoFinnigan LCQadvantage(ソフトウェアXcalibur)]]で分析した結果、質量( $m/z$ ,  $MH^+$ )は $m/z$ 430.1であることが分った。この質量分析の結果を図6に示す。

## [0052] 実施例6

ヒドロキシル基をtert-ブチル基で保護したセリンのベンジルエステルの代りに、ヒドロキシル基をtert-ブチル基で保護したトレオニンのベンジルエステルを用いること以外は、実施例1と全く同様に操作して、ラセミ型グリシルプロリルイソロイシルグリシルトレオニン(配列表配列番号4)を製造した。このものの質量( $m/z$ 、 $MH^+$ )は $m/z$ 444.3であった。

## [0053] 実施例7

実施例1〜4の上皮系細胞増殖促進剤について、マウスの毛包上皮細胞についての細胞増殖試験を行った。なお、培養培地、試験培地としては、以下のものを用いた。

## [0054] (a) 培養培地

DMEM(シグマ社製、製品記号「D-5523」)

FBS(カンセラ・インターナショナル・インコーポレーテッド社製、製品記号「10100756」)

10%

ペニシリン／ストレプトマイシン(ギブコ社製、製品記号「15140-122」)

1%

## (b) 試験培地

MCDB153(シグマ社製、製品記号「M7403」)

インシュリン(シグマ社製、ウシ由来、製品記号「16634」)

5  $\mu$ g/ml

アポトランスフェリン(シグマ社製、ヒト由来、製品記号「T1147」)

10  $\mu$ g/ml

EGF(アップステート・バイオテクノロジー社製、マウス由来、製品記号「01-101」)

5ng/ml

BPE(ギブコ社製、ウシ下垂体抽出物、製品記号「13028-014」)

35  $\mu$ g/ml

水溶性ハイドロコチゾン(ナカライ社製、製品記号「174-00」)

0.5  $\mu$ g/ml

エタノールアミン(和光社製、製品記号「012-12455」)

100  $\mu$  M

o-ホスホリルエタノールアミン(シグマ社製、製品記号「P0503」)

100  $\mu$  M

[0055] (1) 毛包上皮細胞の分離及び培養

新生仔マウス(生後5日齢)の皮膚から手術メスを用いて約2mm幅の短冊状に皮膚片を切り出し、5%濃度でFBS(カンセラ・インターナショナル・インコーポレーテッド社製、製品記号「10100756」)を含むDMEM(シグマ社製、製品記号「D-5523」)中に500U/mlの割合で、デイスパーゼ(合同酒精社製、ロット番号0101)を溶解した溶液中に浸漬し、4℃において16時間静置した。次いでピンセットを用いて皮膚片から表皮を剥離除去し、真皮組織のみを採取し、このようにして得られた真皮組織をPBS(-)(シグマ社製、製品記号「P-4417」)に浸し、眼科バサミを用いて細切した。このようにして得られたストリップ片を、5%濃度でFBSを含むDMEM中に、0.2%濃度でコラーゲナーゼ(新田社製、ロット番号001014W)を溶解した溶液中に浸し、37℃において1時間消化したのち、1000rpmで5分間遠心分離して上清を除去し、残分にPBS(-)を加えてゆるやかにピペッティングすることにより真皮懸濁液を調製した。

[0056] 次いで、この真皮懸濁液中から真皮繊維芽細胞と毛球を分離するため、15分間静置させて毛球のみを沈殿させた。この「静置→沈殿」の操作を3回行って得られた毛球を、2.65mM EDTA水溶液中に0.25%濃度のトリプシンを溶かした液に浸し、37℃において5分間処理することにより毛包上皮細胞の分散溶液を調製した。

次に、この分散液を1000rpmで5分間遠心分離し、遠心分離後上清を除去した。得られた毛包上皮細胞を培養培地に分散させ、コラーゲンコートした96穴マイクロプレートに播種し、5%CO<sub>2</sub>を含む雰囲気中、37℃で培養した。

[0057] (2) 細胞増殖試験

(i) 試料の調製

実施例1〜4で得られたイソロイシルグリシルセリン(以下IGSと略記する)、プロリルイソロイシルグリシン(以下PIGと略記する)、プロリルイソロイシルグリシルセリン(配列

表配列番号2) (以下PIGSと略記する) 及びグリシルプロリルイソロイシルグリシン (配列表配列番号1) (以下GPIGと略記する) をそれぞれ試験培地に溶解し、いずれも0.3  $\mu$  M、1  $\mu$  M、3  $\mu$  M、10  $\mu$  M、30  $\mu$  M及び100  $\mu$  Mの6種類の濃度の試料を調製した。また、対照として試験培地のみを用いた。

[0058] (ii) 毛包上皮細胞増殖試験

細胞を播種してから24時間後、培養液を除去し、培養細胞をMCDB153溶液で洗浄した。この培養細胞に前記の試料を100  $\mu$  lずつ各穴に加え、5%CO<sub>2</sub> 含有雰囲気中、37°Cにおいて培養した。

[0059] 4日後、アラマー・ブルー試薬 (登録商標名、バイオソース社製、カタログ番号DAL 1100、ロット番号AB083002) を各穴ごとに10  $\mu$  lずつ添加し、再び5%CO<sub>2</sub> 雰囲気中、37°Cにおいて培養を継続した。2時間培養したのち、マイクロプレートリーダー (ラボシステムズ社製、製品名「フルオロスキャンアセントFL」) で蛍光強度 (励起波長; 544nm、測定波長; 590nm) を測定し、細胞数を評価した。

[0060] なお、評価は、実施例1〜4で得られたペプチドの細胞増殖度を、対照の細胞増殖度に対する比率 (百分率) で算出し、細胞増殖比の平均値 $\pm$ 標準偏差 (n=5) で表わして行った。有意差の検定は、ダネットの多重比較検定 (アバカスコンセプト社製、ソフトウェア「スーパーアノヴァ V. 1. 11」) により行い、危険率5%未満 (p<0. 05) の場合、有意差ありとした。このようにして得られたIGSの結果を図7に、PIGの結果を図8に、PIGSの結果を図9に、GPIGの結果を図10に、それぞれ棒グラフとして示す。

[0061] (iii) 結果

図7より、IGSについては、0.3、1、3、10、30及び100  $\mu$  Mの細胞増殖率は、対照群と比較してそれぞれ98、103、106、124、134及び133%であり、10  $\mu$  M以上の濃度で有意差 (すべてp<0. 01) が認められた。

[0062] 図8より、PIGについては、0.3、1、3、10、30及び100  $\mu$  Mの細胞増殖率は、対照群と比較してそれぞれ101、103、113、132、131及び134%であり、1  $\mu$  M以上の濃度で有意差 (3  $\mu$  M:p<0. 05; 10、30及び100  $\mu$  M:p<0. 01) が認められた。

- [0063] 図9より、PIGSについては、0.3、1、3、10、30及び100  $\mu$  Mの細胞増殖率は、対照群と比較してそれぞれ104、103、108、110、127及び133%であり、3  $\mu$  M以上の濃度で有意差(3及び10  $\mu$  M:  $p < 0.05$ ; 30及び100  $\mu$  M:  $p < 0.01$ )が認められた。
- [0064] 図10より、GPIGについては、0.3、1、3、10、30及び100  $\mu$  Mの細胞増殖率は、対照群と比較してそれぞれ105、108、118、133、134及び138%であり、0.3  $\mu$  M以上の濃度で有意差(0.3  $\mu$  M:  $p < 0.05$ ; 1、3、10、30及び100  $\mu$  M:  $p < 0.01$ )が認められた。
- [0065] しかも、表皮細胞、真皮繊維芽細胞及び毛乳頭細胞に対する試験を行ったところ、本発明の上皮系細胞増殖促進剤は、表皮細胞に対しては毛包上皮細胞と同様に細胞増殖作用を示したものの、真皮繊維芽細胞及び毛乳頭細胞に対しては何らの影響も与えないことが分った。
- [0066] 実施例8
- 実施例5で得られたペンタペプチド1mgを注射用水(大塚製薬社製、製品記号「057-00456」)300  $\mu$  lに溶解し、プロピレングリコール(和光社製、製品記号「161-05006」)200  $\mu$  l及びエチルアルコール(和光社製、製品記号「057-00456」)500  $\mu$  lを加えて混合し、濃度1mg/mlの上皮系細胞増殖促進剤を製剤した。
- 別に7週齢のC3H/He系雌マウス10匹を1週間飼育し、馴化させたのち、毛周期が休止期にあるマウスの背部毛を電気バリカン及び電気シェーバーを用いて剃毛して実験用動物とした。
- [0067] 次に、この実験用動物を5匹ずつの2グループに分け、剃毛後3日目から第1グループには1日1回剃毛部位に100  $\mu$  l/匹の上皮系細胞増殖促進剤を塗布し、第2グループには、対照用として注射用水とプロピレングリコールとエチルアルコールの混合物(体積比3:2:5)のみを塗布した。塗布後14日目に剃毛部位をデジタルカメラで撮影したところ、本発明の上皮系細胞増殖促進剤を塗布したグループ(B)は、対照グループ(A)に比べ明らかに発毛促進が認められた。
- [0068] 次に、この画像をコンピューターに入力し、画像解析ソフトを用いて再生毛面積比(再生毛部位のピクセル数/剃毛部位のピクセル数)を百分率で算出した。有意差の

検定は、スチューデントのt検定(アバカスコンセプツ社製ソフトウェア「stattviewer J-4. 02」)により行い、危険率5%未満( $p < 0. 05$ )の場合、有意差ありとした。

[0069] その結果を図11に示した。この図において、白い部分が毛が生えていない部分であり、黒い部分が毛が生えている部分である。この結果によると、対照グループ(A)の再生毛面積比は、 $36. 9\% \pm 5. 7\%$ であるのに対し、本発明の上皮系細胞増殖促進剤を塗布したグループ(B)の再生毛面積比は $66. 6 \pm 3. 5\%$ であり、有意( $p < 0. 01$ )に毛の再生が促進されることが分った。

#### [0070] 実施例9

実施例5で得られたオリゴペプチドの上皮系細胞増殖促進剤としての細胞選択性を確認するために、以下のようにして皮膚組織に存在する細胞すなわち毛包上皮細胞、表皮細胞、真皮繊維芽細胞及び毛乳頭細胞に対する細胞増殖作用の有無を調べた。なお、培養培地、試験培地としては、実施例7と同じものを用いた。

#### [0071] (1) 毛包上皮細胞、表皮細胞、真皮繊維芽細胞及び毛乳頭細胞の調製

生後5日齢のC3H/HeN系新生仔マウスの皮膚を無菌的に採取し、手術用メスを用いて皮膚片を約2mm幅の短冊状のサンプルとした。5質量%のFBS(カンセラ・インターナショナル・インコーポレーテッド社製、ロット番号0101)を含むDMEM(シグマ社製、製品記号「D-5523」)中に500U/mlのディスパーゼ(合同酒精社製、ロット番号0101)を溶かした溶液を調製し、この中に上記サンプルを浸し、4℃において16時間静置したのち、ピンセットを用いて皮膚片から表皮組織を剥離し、真皮組織と分離した。得られた表皮組織は表皮細胞の分離に、また真皮組織は毛包上皮細胞及び真皮繊維芽細胞の分離に供した。

[0072] このようにして得られた真皮組織を(PBS)(-) (シグマ社製、製品記号「P-4417」)に浸し、眼科バサミを用いて細切りし、5質量%のFBSを含むDMEM中に0. 2質量%のコラゲナーゼ(新田社製、ロット番号001014W)を溶かした液に浸し、37℃において1時間消化した。このようにして得られた真皮消化液を1000rpmで5分間遠心分離し、上清を除去したのち(PBS)(-)を加えて緩やかにピペッティングし、真皮懸濁液を調製した。

[0073] 次いで、この真皮懸濁液中から真皮繊維芽細胞と毛球を分離するため、15分間静



置させて毛球のみを沈殿させた。この「静置→沈殿」の操作を3回行った。得られた毛球を、2.65mM EDTA水溶液中に0.25質量%のトリプシンを溶かした液に浸し、37℃において5分間処理することにより毛包上皮細胞分散溶液を調製した。

[0074] 次に、この分散液を1000rpmで5分間遠心分離し、遠心分離後上清を除去した。得られた毛包上皮細胞を培養培地に分散させ、コラーゲンコートした96穴マイクロプレートに播種し、5%CO<sub>2</sub>を含む雰囲気中、37℃で培養した。

[0075] 他方、一回目の「静置→沈殿」の操作で上清に浮遊している真皮繊維芽細胞を回収し、1000rpmで5分間遠心分離し、遠心分離後上清を除去した。得られた真皮繊維芽細胞を培養培地に分散させ、96穴マイクロプレートに播種し、5%CO<sub>2</sub>を含む雰囲気中、37℃で培養した。

[0076] 上記の表皮組織を、2.65mM EDTA水溶液中に0.25質量%のトリプシンを溶かした溶液に浸し、37℃において5分間処理することにより、表皮細胞分散液を調製した。

次いで、この分散液を1000rpmで5分間遠心分離し、上清を除去した。得られた表皮細胞を培養培地に分散させ、コラーゲンコートした96穴マイクロプレートに播種し、5%CO<sub>2</sub>を含む雰囲気中、37℃において培養した。

また、ヒト毛乳頭細胞(トーヨーボー社製、製品記号「602-05」)を培養培地に分散させ、コラーゲンコートした96穴マイクロプレートに播種し、5%CO<sub>2</sub>を含む雰囲気中、37℃において培養した。

[0077] (2)細胞増殖試験

(i)試料の調製

実施例5で得られたペンタペプチド1mgを、試験培地232.8μlに加え、かきまぜて溶解することにより、10mM溶液を調製した。次いで、この10mM溶液を段階的に希釈し、100μM(No. 1)、30μM(No. 2)、10μM(No. 3)、3μM(No. 4)、1μM(No. 5)及び0.3μM(No. 6)濃度の6種類の試料を調製し、また対照としては試験培地のみを用いた。

[0078] (ii)毛包上皮細胞及び表皮細胞増殖試験

細胞を播種してから24時間後、培養液を除去し、培養細胞をMCDB153溶液で

洗浄した。この培養細胞に前記の試料を $100\ \mu\text{l}/\text{well}$ に加え、 $5\%\text{CO}_2$ 含有雰囲気中、 $37^\circ\text{C}$ において培養した。4日後、アラマーブルー試薬(登録商標名、バイオソース社製、カタログ番号DAL1100、ロット番号AB083002)を各wellに $10\ \mu\text{l}$ ずつ添加し、再び $5\%\text{CO}_2$ 含有雰囲気中、 $37^\circ\text{C}$ において培養した。2時間後、マイクロプレートリーダー(ラボシステムズ社製、製品名「フルオロスキャンアセントFL」)で蛍光強度(励起波長; $544\text{nm}$ 、測定波長; $590\text{nm}$ )を測定し、細胞数を評価した。有意差の検定は、ダネットの多重比較検定(アバカスコンセプツ社製、ソフトウェア「スーパーアノヴァ V. 1. 11」)により行い、危険率 $5\%$ 未満( $p < 0. 05$ )の場合、有意差ありとした。

このようにして得られた毛包上皮細胞増殖試験結果を図12に、また表皮細胞増殖試験の結果を図13にそれぞれ棒グラフとして示す。

[0079] (iii) 真皮繊維芽細胞及び毛乳頭細胞増殖試験

細胞を播種してから24時間後、培養液を除去し、培養細胞をDMEM溶液で洗浄した。この培養細胞に前記の試料を $100\ \mu\text{l}/\text{well}$ を加え、 $5\%\text{CO}_2$ 含有雰囲気中、 $37^\circ\text{C}$ において培養した。またこの際、陽性対照として培養培地を用いて同様に培養した。3日後、アラマーブルー試薬(バイオソース社製、製品記号「341-077612」)を各wellに $10\ \mu\text{l}$ ずつ添加し、再び $5\%\text{CO}_2$ 含有雰囲気中、 $37^\circ\text{C}$ において培養した。2時間後、マイクロプレートリーダー(ラボシステムズ社製、製品名「フルオロスキャンアセントFL」)で蛍光強度(励起波長; $544\text{nm}$ 、測定波長; $590\text{nm}$ )を測定し、細胞数を評価した。

このようにして得られた真皮繊維芽細胞試験の結果を図14に、毛乳頭細胞試験の結果を図15にそれぞれ棒グラフとして示す。

[0080] (iv) 結果

図12より、毛包上皮細胞では、各試料の細胞増殖率は対照と比較して、それぞれ $101\%$  (No. 6)、 $111\%$  (No. 5)、 $124\%$  (No. 4)、 $141\%$  (No. 3)、 $142\%$  (No. 2)及び $141\%$  (No. 1)であり、 $1\ \mu\text{M}$ 濃度以上で有意差( $p < 0. 01$ )が認められた。

このことから、実施例5の上皮細胞増殖促進剤は $1\ \mu\text{M}$ から用量依存的な毛包上皮細胞増殖促進作用を示すことが分った。

[0081] 図13より、表皮細胞では、各試料の細胞増殖率は対照と比較して、それぞれ102% (No. 6)、110% (No. 5)、118% (No. 4)、124% (No. 3)、127% (No. 2) 及び127% (No. 1)であり、1  $\mu$  M濃度以上で有意差(1  $\mu$  Mの場合 $p < 0.05$ 、3  $\mu$  M以上の濃度の場合 $p < 0.01$ )が認められた。

このことから、実施例5の上皮細胞増殖促進剤は毛包上皮細胞に加えて表皮細胞に対してもまた1  $\mu$  Mから用量依存的な増殖促進作用を示すことが分った。

[0082] 一方、図14及び図15から、真皮繊維芽細胞及び毛乳頭細胞に対しては何らの影響も与えないことが分かる。

これらの事実より、実施例5の上皮系細胞増殖促進剤は、上皮系細胞に分類される毛包上皮細胞及び表皮細胞に対して選択的に細胞増殖作用を示すことが分った。

[0083] このように、本発明の上皮系細胞増殖促進剤は、上皮系細胞に分類される毛包上皮細胞及び表皮細胞に対して選択的に細胞増殖作用を示すので、塗布剤例えばローション剤として用いた場合に、皮膚組織を構成する上皮系細胞以外の細胞に悪影響を及ぼさない。

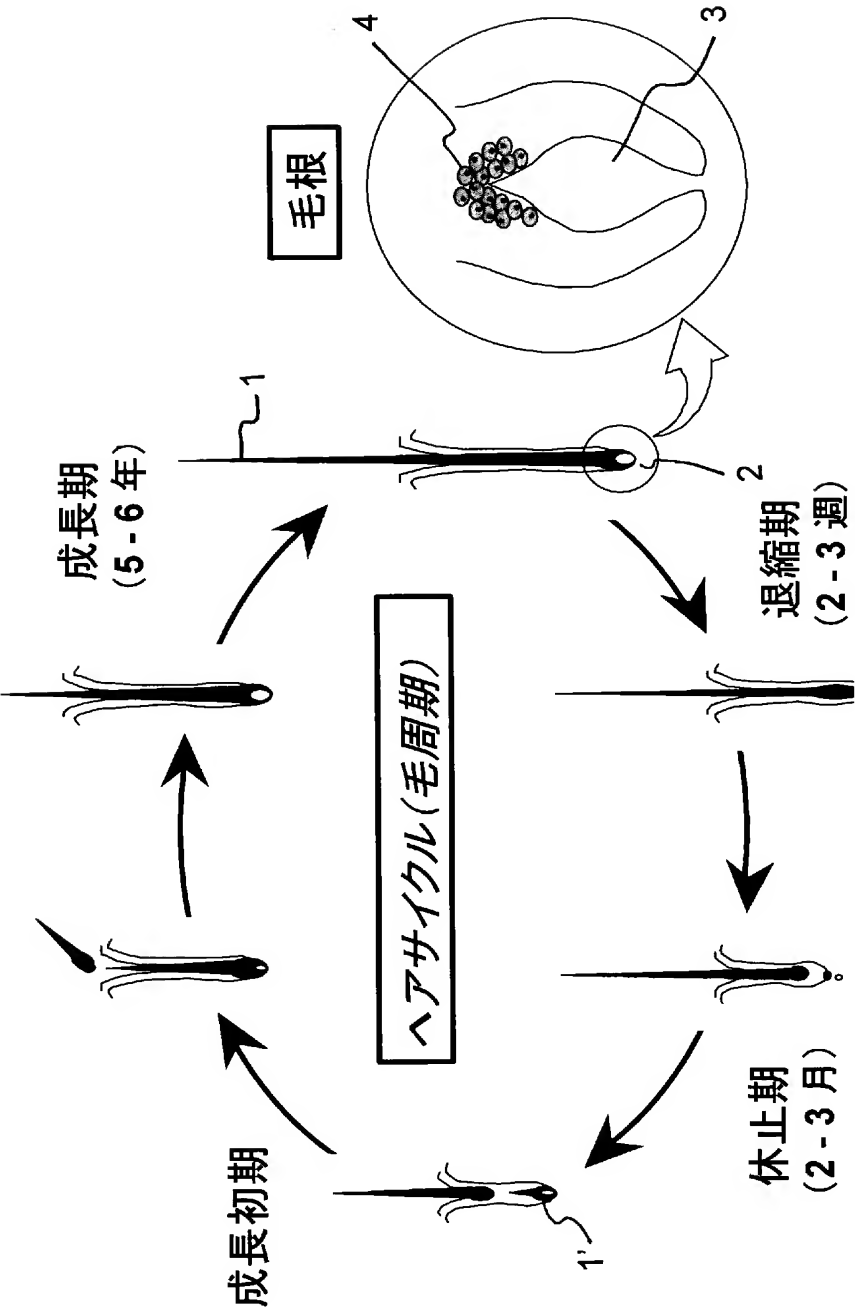
#### 産業上の利用可能性

[0084] 本発明の化合物は、上皮系細胞増殖促進剤として、育毛用、皮膚再生用に利用することができる。また、本発明によると、育毛効果のみでなく、皮膚再生効果、アトピー性皮膚炎治療効果を奏する優れた新規な上皮系細胞増殖促進剤が提供される。

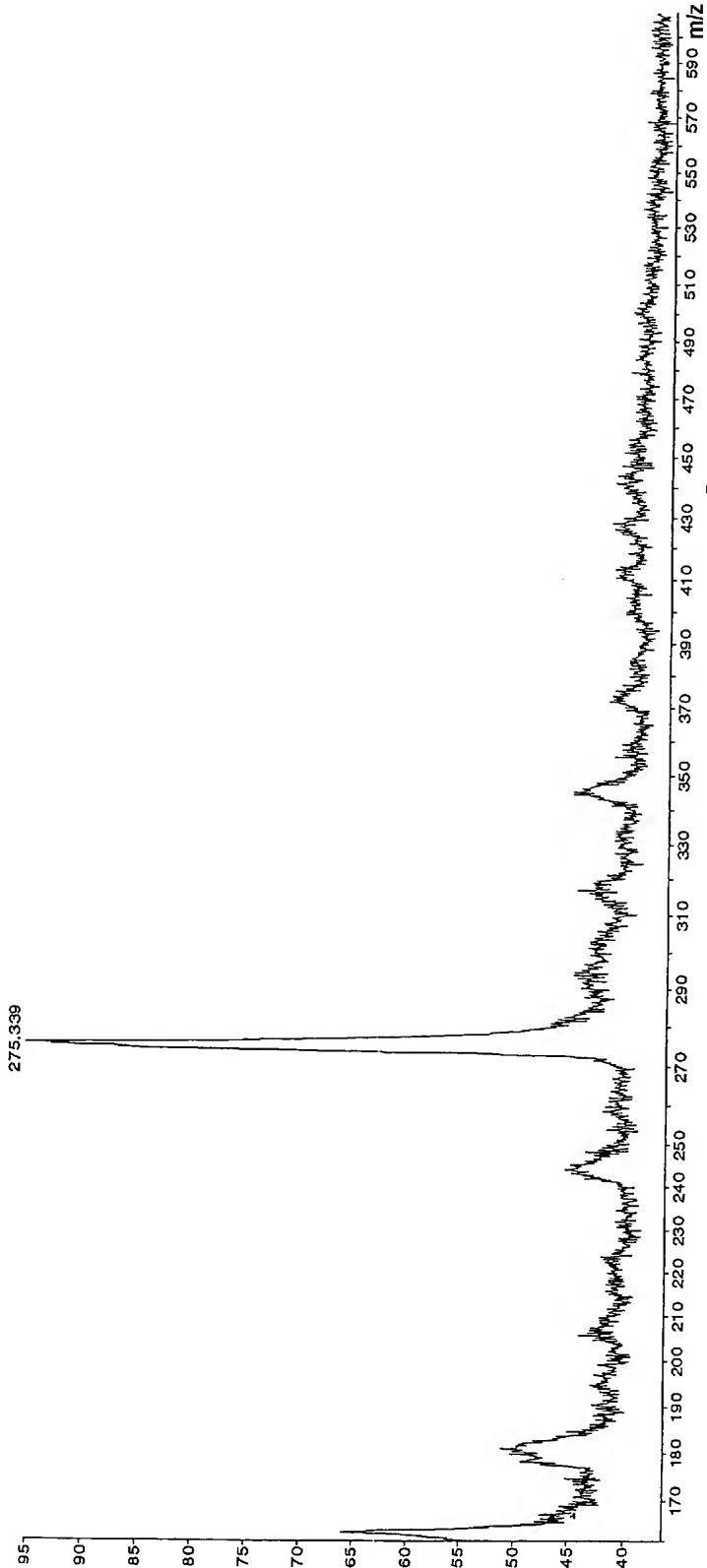
## 請求の範囲

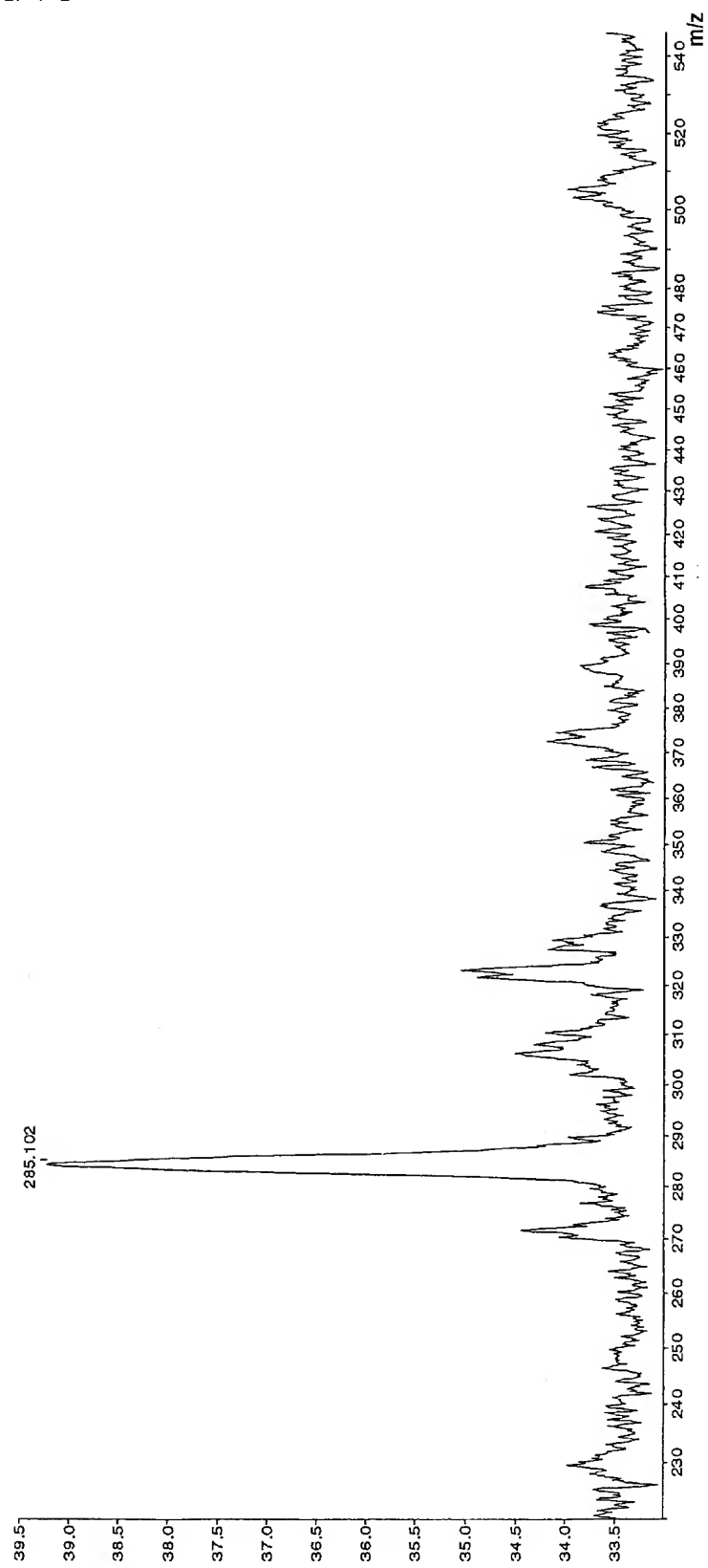
- [1]      プロリルイソロイシルグリシル単位又はイソロイシルグリシルセリル単位を含むアミノ酸単位3〜7個までの水溶性オリゴペプチド及びそれらの水溶性塩。
- [2]      プロリルイソロイシルグリシンである請求の範囲第1項記載の水溶性オリゴペプチド及びその水溶性塩。
- [3]      イソロイシルグリシルセリンである請求の範囲第1項記載の水溶性オリゴペプチド及びその水溶性塩。
- [4]      プロリルイソロイシルグリシル単位とグリシル単位又はセリル単位からなる請求の範囲第1項記載の水溶性オリゴペプチド及びその水溶性塩。
- [5]      グリシルプロリルイソロイシルグリシンである請求の範囲第4項記載の水溶性オリゴペプチド及びその水溶性塩。
- [6]      プロリルイソロイシルグリシルセリンである請求の範囲第4項記載の水溶性オリゴペプチド及びその水溶性塩。
- [7]      グリシルプロリルイソロイシルグリシル単位とセリル単位又はトレオニル単位からなる請求の範囲第1項記載の水溶性オリゴペプチド及びその水溶性塩。
- [8]      グリシルプロリルイソロイシルグリシルセリンである請求の範囲第7項記載の水溶性オリゴペプチド及びその水溶性塩。
- [9]      グリシルプロリルイソロイシルグリシルトレオニンである請求の範囲第7項記載の水溶性オリゴペプチド及びその水溶性塩。
- [10]     請求の範囲第1ないし9項のいずれかに記載の水溶性オリゴペプチド及びそれらの水溶性塩の中から選ばれた少なくとも1種を有効成分とする上皮系細胞増殖促進剤。  
。
- [11]     育毛剤のための請求の範囲第10項記載の上皮系細胞増殖促進剤。
- [12]     毛髪休止期に作用する育毛剤のための請求の範囲第11項記載の上皮系細胞増殖促進剤。

[図1]

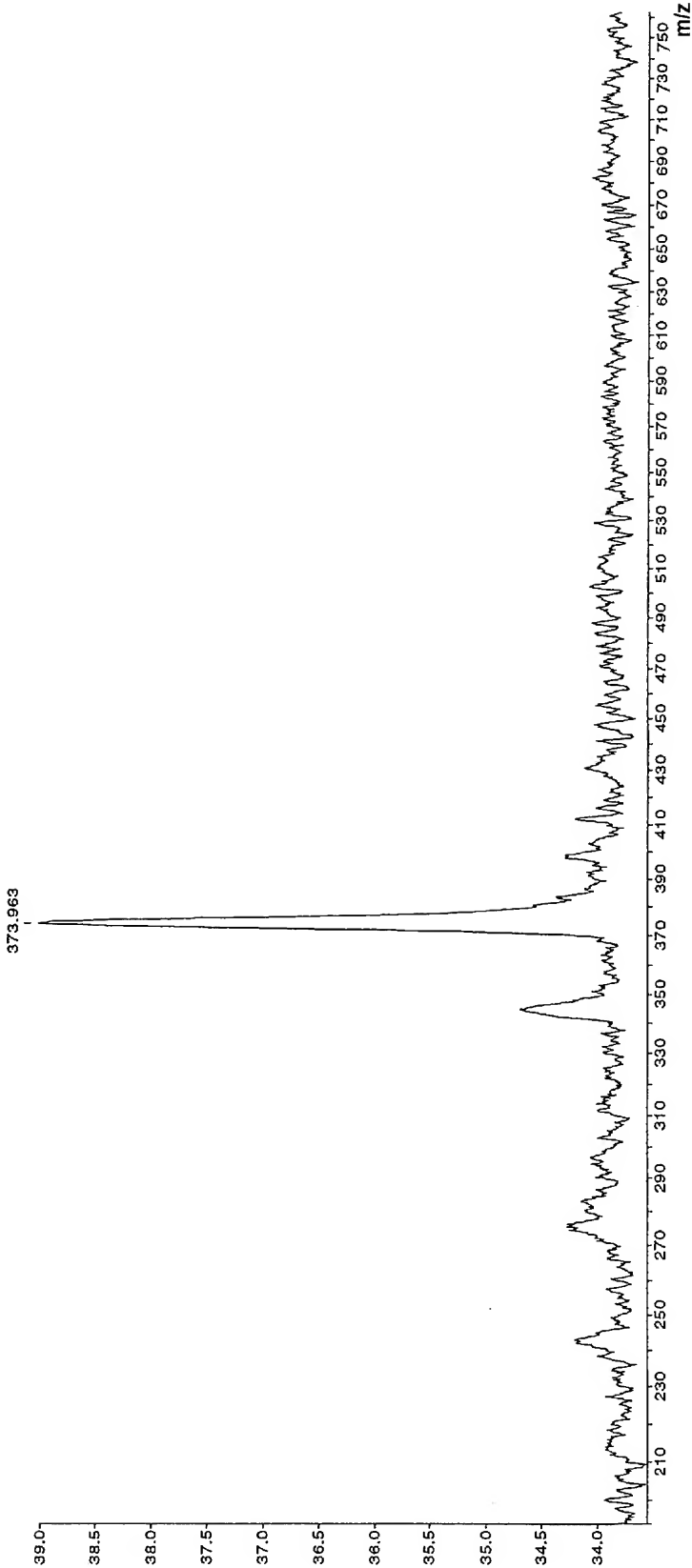


[図2]



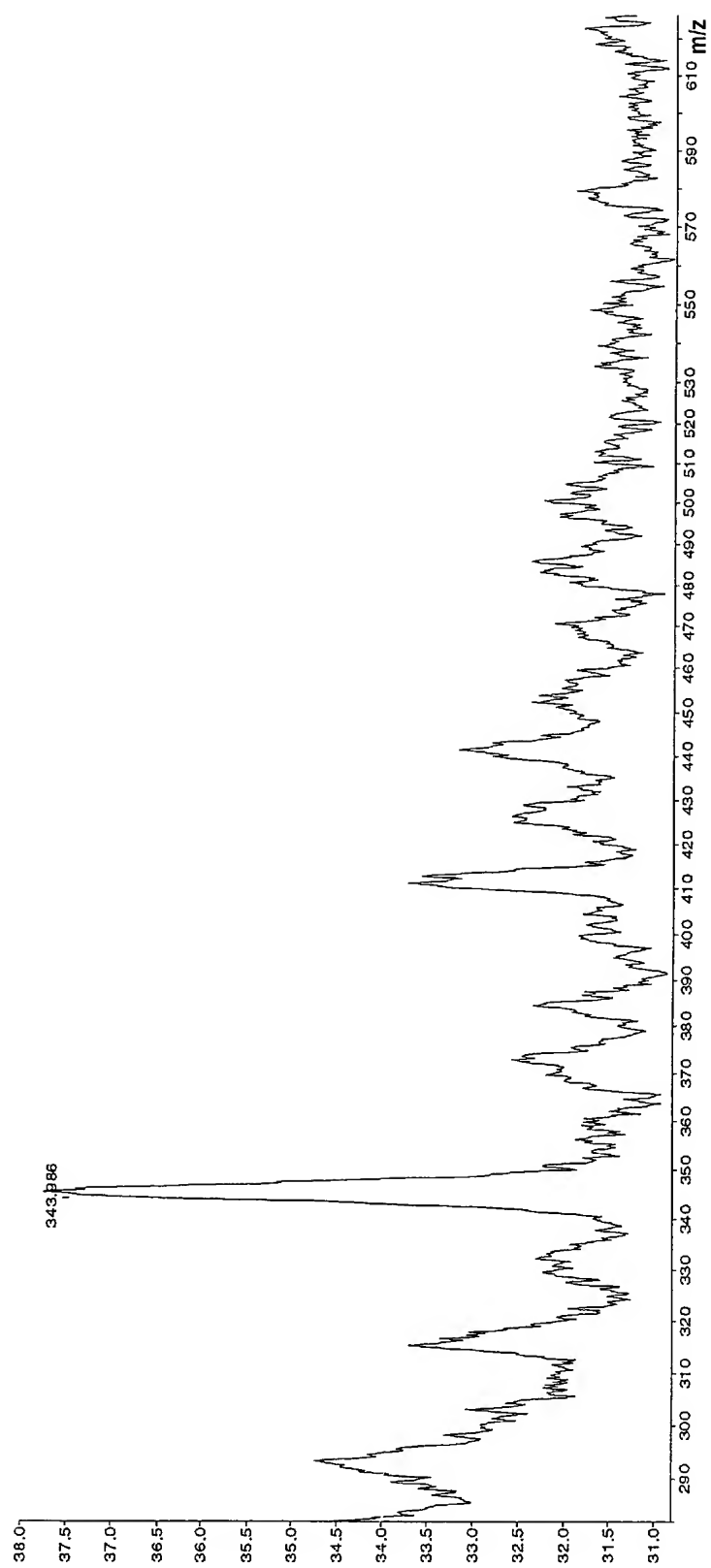
[3]

[図4]

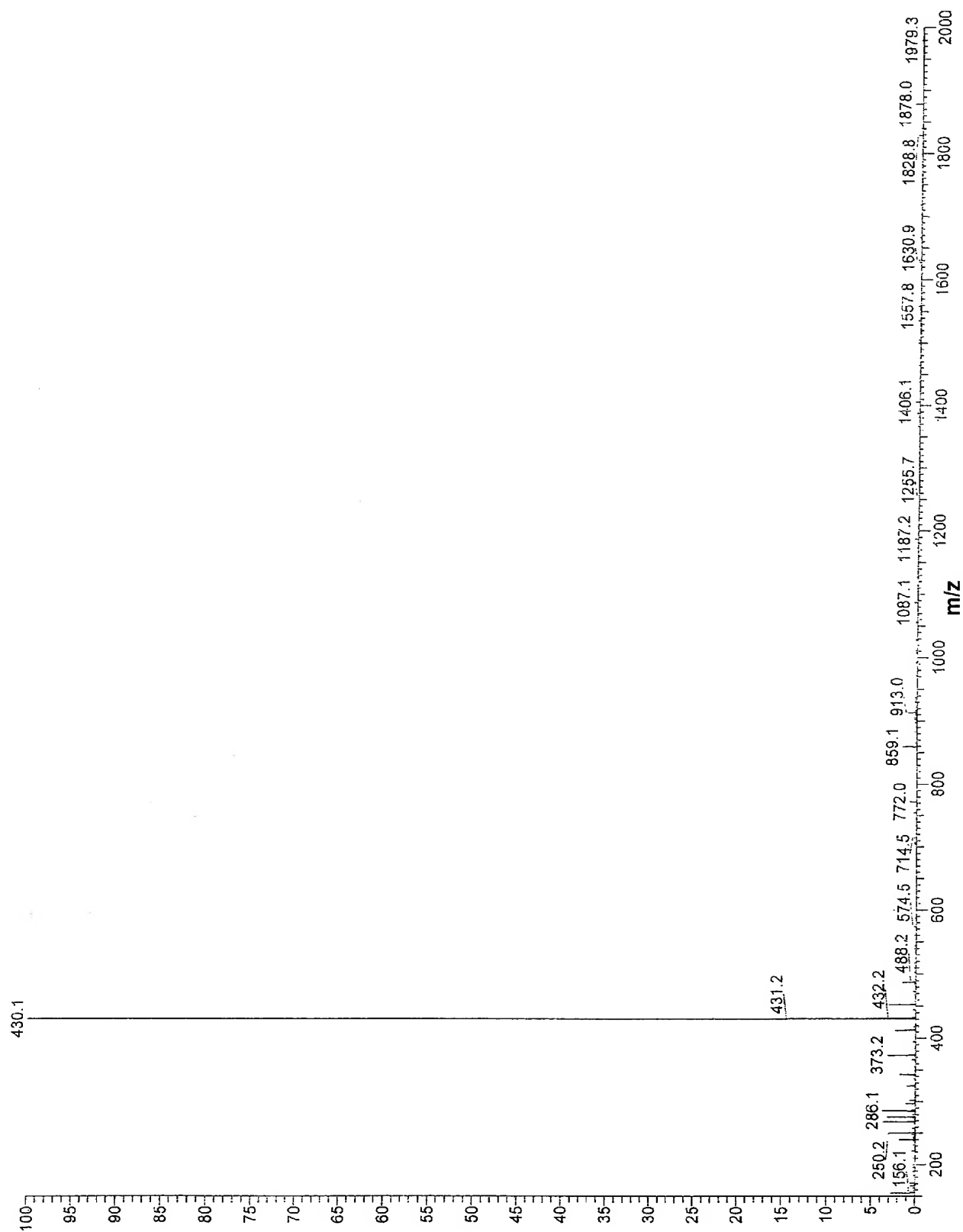




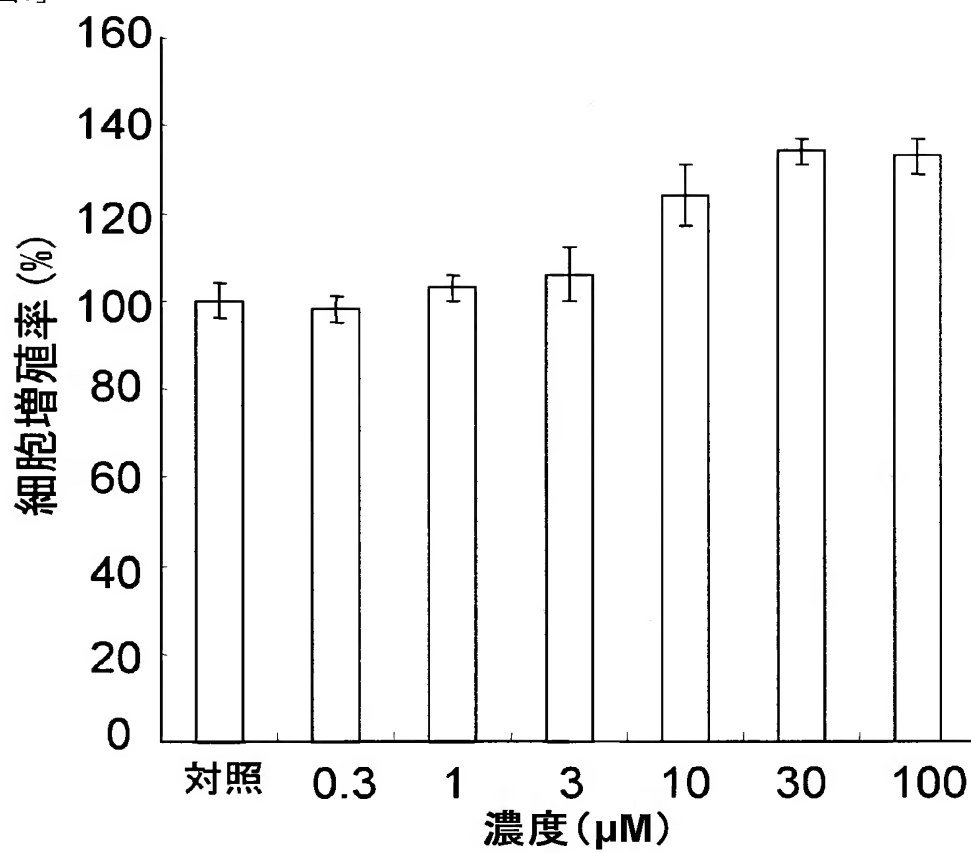
[図5]



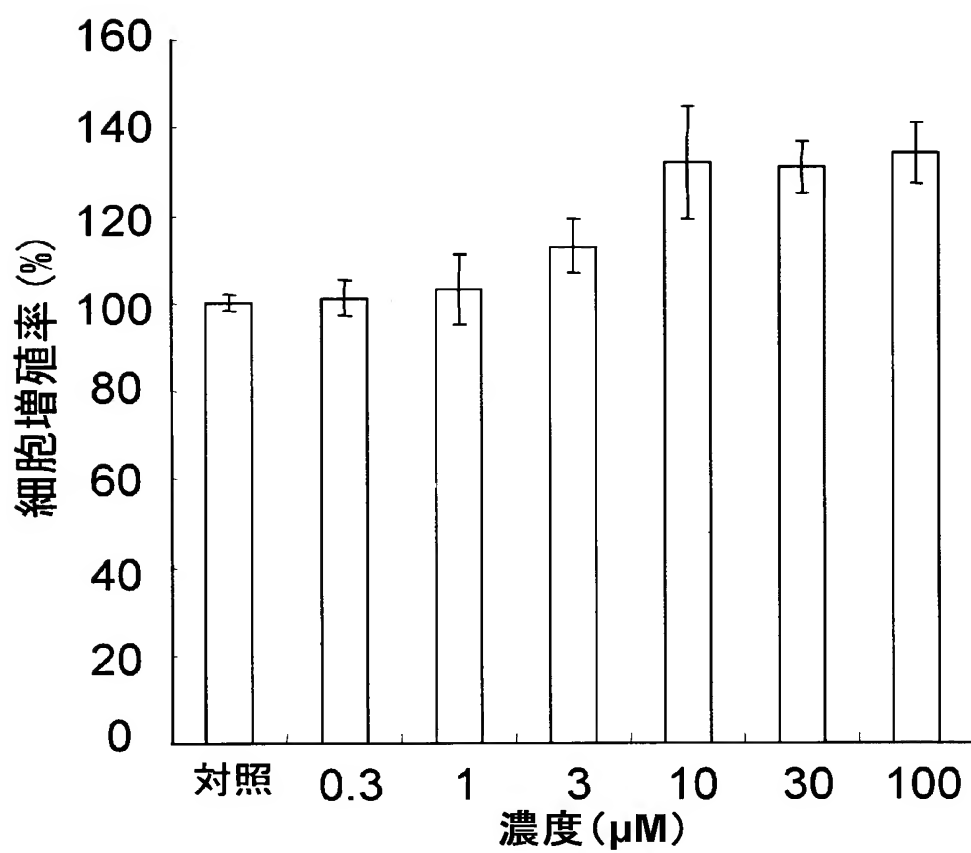
[図6]



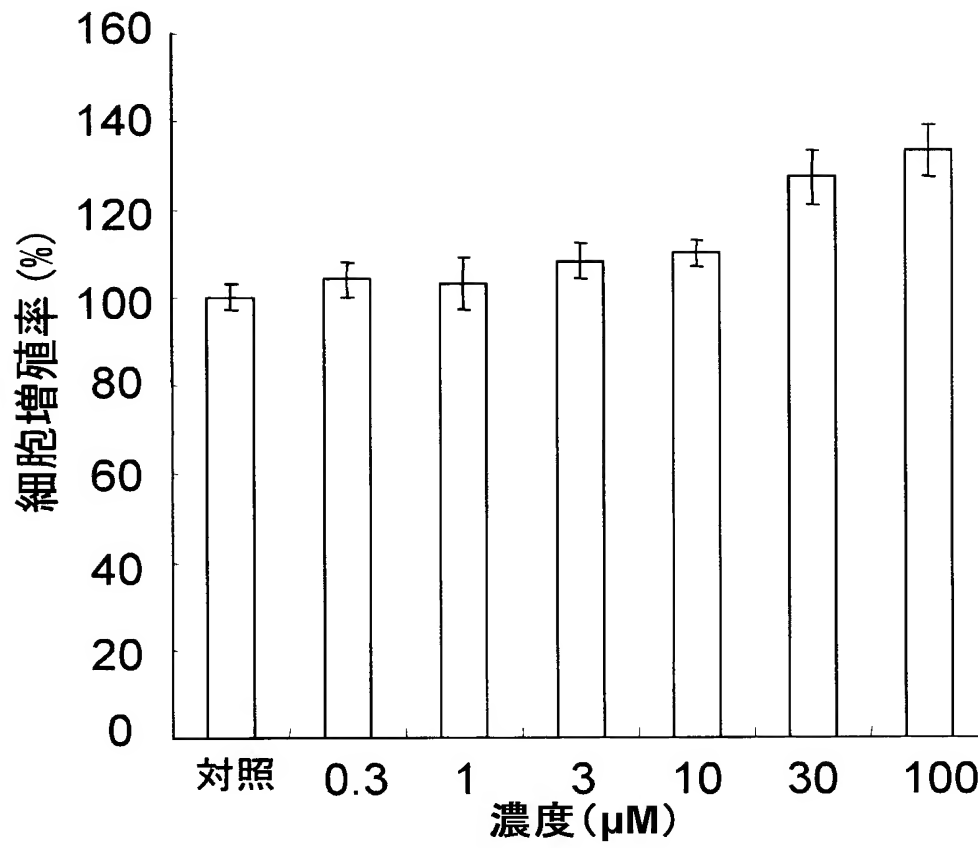
[図7]



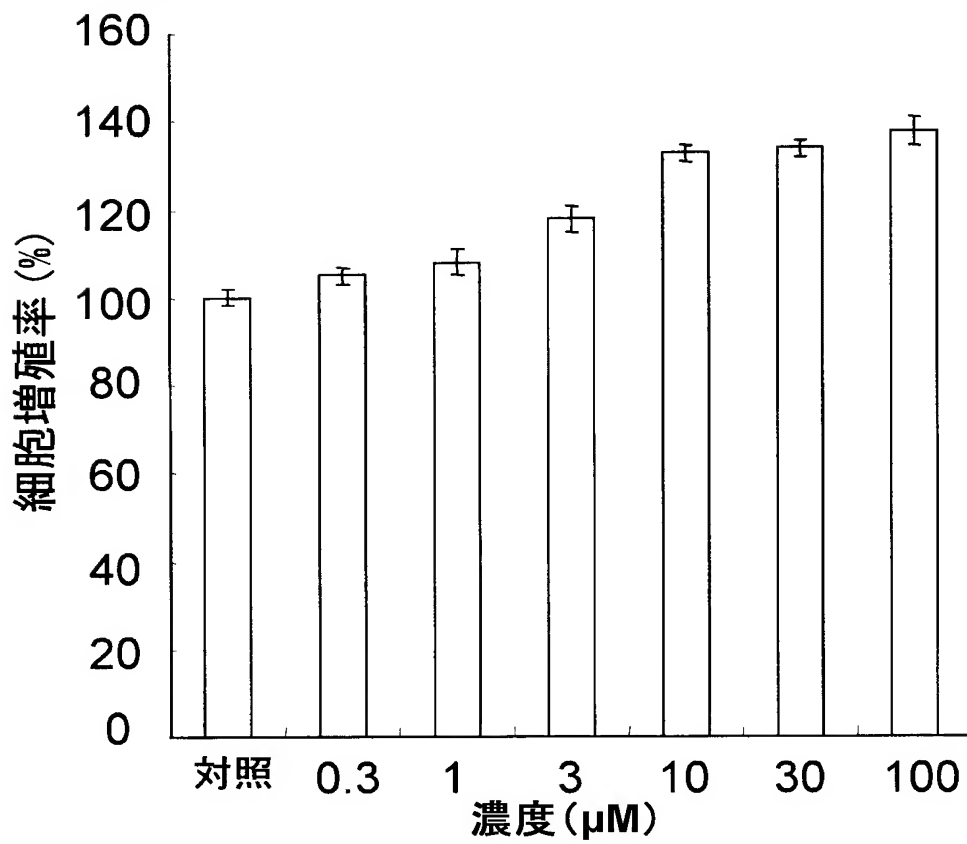
[図8]



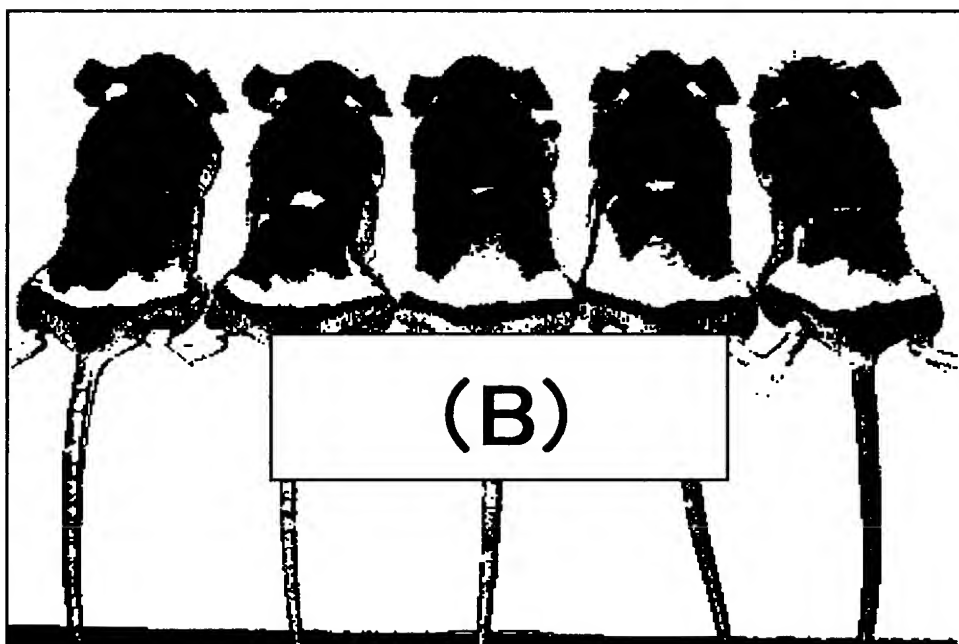
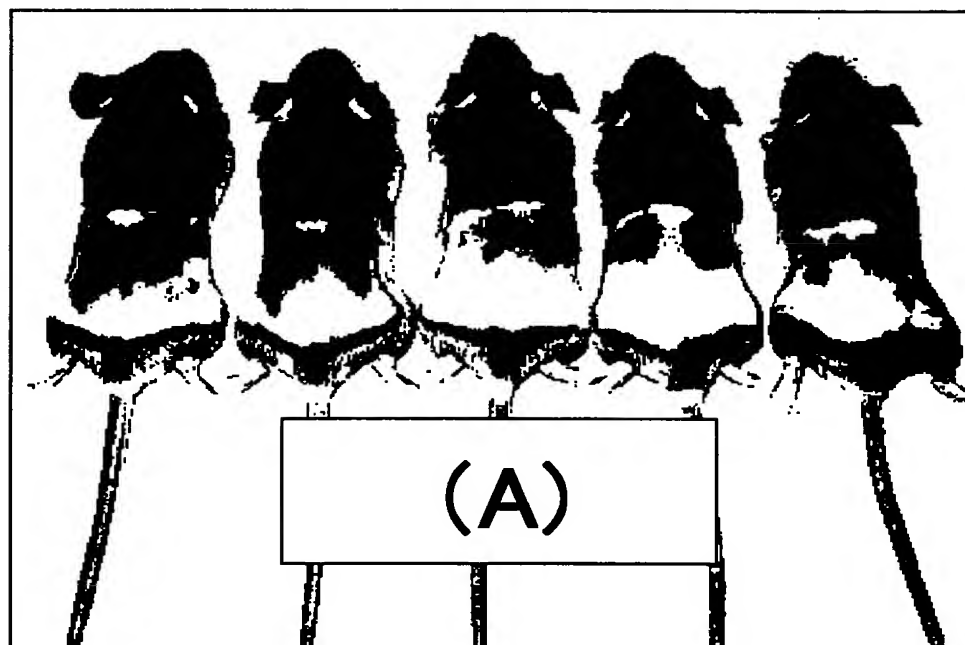
[図9]



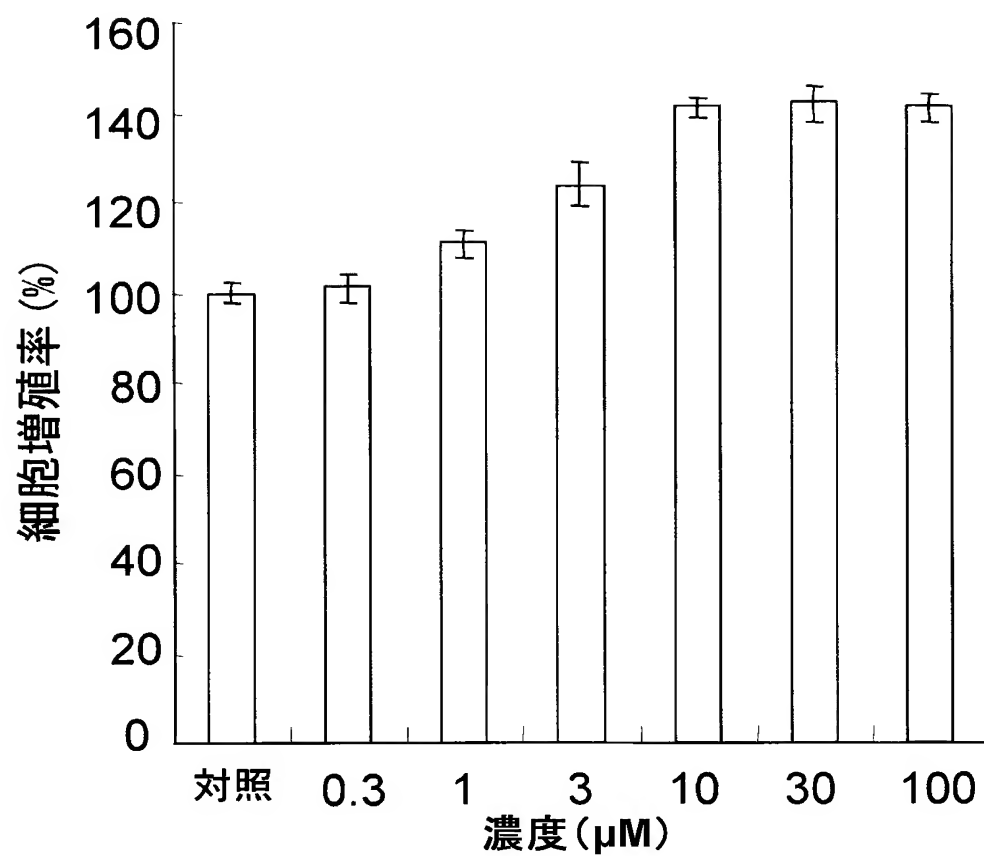
[図10]



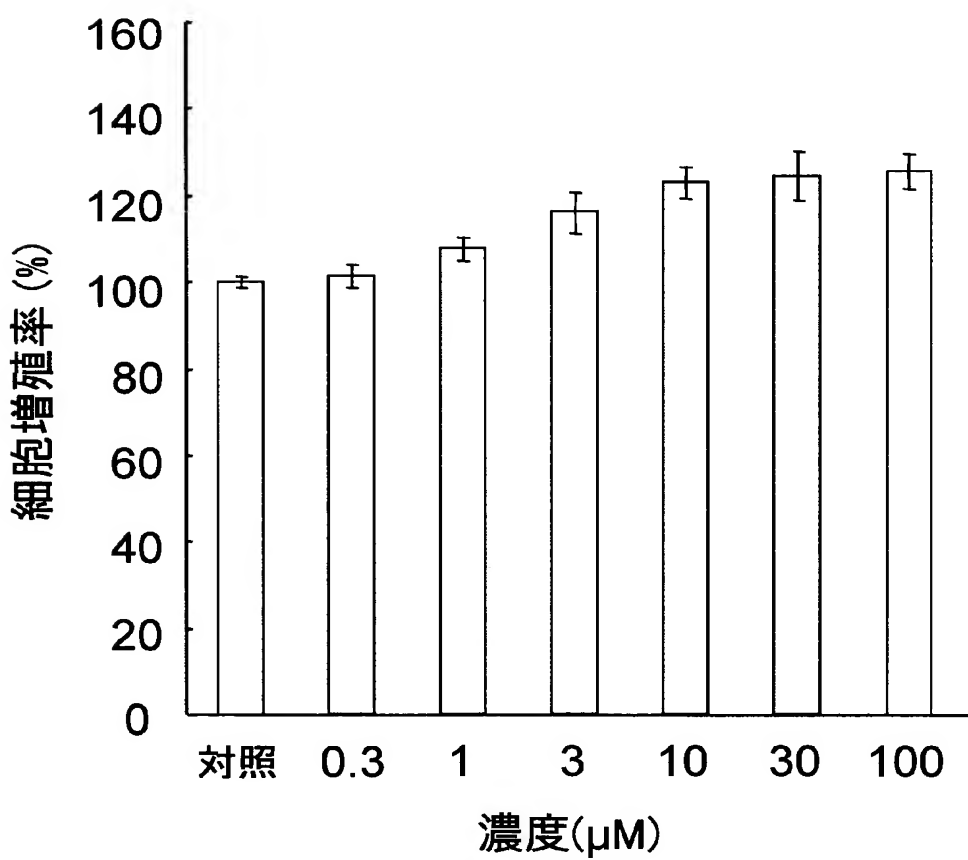
[図11]



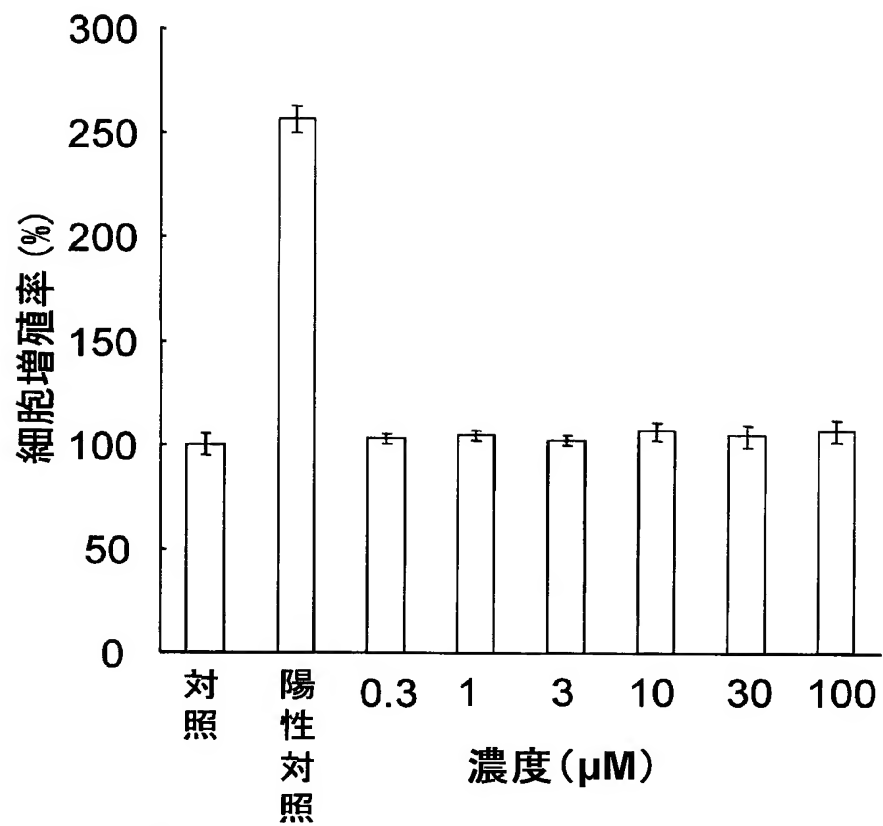
[図12]



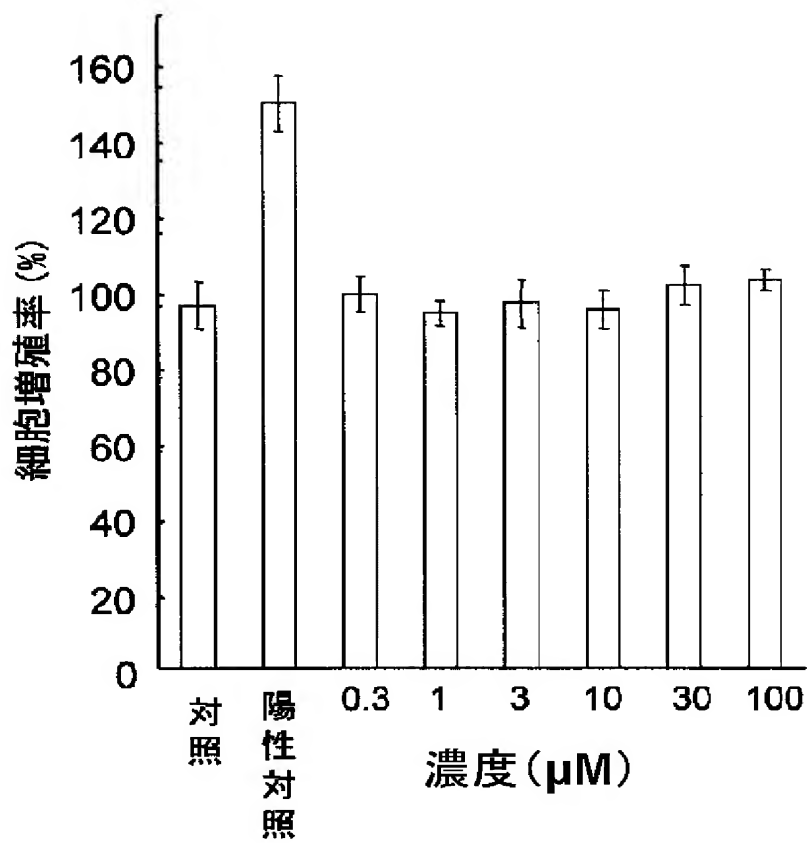
[図13]



[図14]



[図15]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005677

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> C07K5/08, A61K7/06, 38/00, A61P17/14, C07K5/10, 7/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> C07K5/08, A61K7/06, 38/00, A61P17/14, C07K5/10, 7/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST FILE (JOIS), MEDLINE/REGISTRY/CAPLUS (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2003/093314 A2 (MILLENIUM BIOLOGIX INC.), 13 November, 2003 (13.11.03), Claim 23; SEQ.ID.NO: 7, 9, 11, 14, 15, 17 to 20 & EP 1504033 A2	1, 4, 5, 7
X	US 2003/0176354 A1 (INNAPHARMA, INC.), 18 September, 2003 (18.09.03), SEQ.ID.NO: 3, 34, 37, 50 & US 5589460 A & US 5767083 A & WO 2003/087137 A2	1, 4, 6
X	WO 2003/007980 A1 (GERMANY), 30 January, 2003 (30.01.03), Page 6, BMP-1 & DE 10134243 A1 & EP 1455808 A1	1, 4



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 April, 2005 (27.04.05)

Date of mailing of the international search report

17 May, 2005 (17.05.05)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005677

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2002/102832 A1 (SWED.), 27 December, 2002 (27.12.02), SEQ.ID.NO: 6, 7, 10, 11 & EP 1409518 A1 & US 2004/0259805 A1	1, 2, 4
X	US 2002/0168354 A1 (USA), 14 November, 2002 (14.11.02), SEQ.18 & US 2004/0186055 A1	1, 4
X	WO 2001/031019 A2 (CHIRON SPA), 03 May, 2001 (03.05.01), Page 725, 389-394; page 796, 50-54, AMPHI Regions (Family: none)	1, 4
X	WO 2001/075454 A2 (OXFORD GLYCOSCIENCES (UK) LTD.), 11 October, 2001 (11.10.01), Claims 23, 25 & US 2002/0164668 A1 & EP 1325338 A2	1, 4, 7
X	WO 2001/068145 A2 (DUPONT PHARMACEUTICALS COMPANY), 20 September, 2001 (20.09.01), SEQ.NO: 85, 88 & US 2002/0103133 A1 & EP 1263473 A2 & JP 2003-526683 A	1, 4, 7
X	WO 2001/058459 A1 (Mitsubishi-Tokyo Pharmaceuticals, Inc.), 16 August, 2001 (16.08.01), SEQ.NO: 1 & EP 1256348 A1 & US 2003/0157132 A1	1, 4
X	WO 2000/064486 A2 (VERITAS MEDICAL TECHNOLOGIES, INC.), 02 November, 2000 (02.11.00), Page 17, GPIGPX & EP 1176985 A2 & JP 2002-542304 A	1, 4, 7-9
X	US 6093797 A (INNAPHARMA, INC.), 25 July, 2000 (25.07.00), SEQ.ID.NO: 3, 34, 37, 50 & US 5589460 A & US 5767083 A & WO 1999/022758 A1	1, 4
P,X	TSURUDA Akinori et al., A Short Peptide GPIGS Promotes Proliferation of Hair Buld Keratinocytes and Accelerates Hair Regrowth in Mice, Biol.Pharm.Bull., 28(3), 485 to 489(2005)	1-12

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005677

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2000/029425 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 25 May, 2000 (25.05.00), & EP 1132396 A1	1-12

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.<sup>7</sup> C07K5/08, A61K7/06, 38/00, A61P17/14, C07K5/10, 7/06

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.<sup>7</sup> C07K5/08, A61K7/06, 38/00, A61P17/14, C07K5/10, 7/06

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICST ファイル (JOIS), MEDLINE/REGISTRY/CAPLUS (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 2003/093314 A2 (MILLENIUM BIOLOGIX INC.) 2003.11.13, Claim23 SEQ ID.NO.7, 9, 11, 14, 15, 17-20 & EP 1504033 A2	1, 4, 5, 7
X	US 2003/0176354 A1 (INNAPharma, INC.) 2003.09.18 SEQ ID.NO:3, 34, 37, 50 & US 5589460 A & US 5767083 A & WO 2003/087137 A2	1, 4, 6
X	WO 2003/007980 A1 (GERMANY) 2003.01.30 P.6 の BMP-I 参照	1, 4

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27.04.2005

国際調査報告の発送日

17.5.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

植原 克典

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4B

9840

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	& DE 10134243 A1 & EP 1455808 A1	
X	WO 2002/102832 A1 (SWED.) 2002. 12. 27 SEQ ID NO:6, 7, 10, 11 & EP 1409518 A1 & US 2004/0259805 A1	1, 2, 4
X	US 2002/0168354 A1 (USA) 2002. 11. 14 SEQ. 18 & US 2004/0186055 A1	1, 4
X	WO 2001/031019 A2 (CHIRON SPA) 2001. 05. 03 P. 725 の 389-394、P. 796 の 50-54 の AMPHI Regions (ファミリーなし)	1, 4
X	WO 2001/075454 A2 (OXFORD GLYCOSCIENCES (UK) LTD.) 2001. 10. 11 Claim 23, 25 & US 2002/0164668 A1 & EP 1325338 A2	1, 4, 7
X	WO 2001/068145 A2 (DUPONT PHARMACEUTICALS COMPANY) 2001. 09. 20 SEQ. NO:85, 88 & US 2002/0103133 A1 & EP 1263473 A2 & JP 2003-526683 A	1, 4, 7
X	WO 2001/058459 A1 (三菱東京製薬株式会社) 2001. 08. 16 SEQ. NO:1 & EP 1256348 A1 & US 2003/0157132 A1	1, 4
X	WO 2000/064486 A2 (VERITAS MEDICAL TECHNOLOGIES, INC.) 2000. 11. 02 P. 17 の GPIGPX 参照 & EP 1176985 A2 & JP 2002-542304 A	1, 4, 7-9
X	US 6093797 A (INNAPHARMA, INC.) 2000. 07. 25 SEQ ID NO:3, 34, 37, 50 & US 5589460 A & US 5767083 A & WO 1999/022758 A1	1, 4
PX	TSURUDA Akinori et al. , A Short Peptide GPIGS Promotes Proliferation of Hair Buld Keratinocytes and Accelerates Hair Regrowth in Mice, Biol. Pharm. Bull., 28(3)485-489(2005)	1-12
A	WO 2000/029425 A1 (協和醗酵工業株式会社) 2000. 05. 25 & EP 1132396 A1	1-12